

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Adéla Zárybnická

VOLTAMETRIE 7-DEHYDROCHOLESTEROLU NA BÓREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ  
ELEKTRODĚ

Voltammetry of 7-dehydrocholesterol on boron-doped diamond electrode

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2018

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. května 2018.

## Abstrakt:

7-dehydrocholesterol je nepostradatelnou látkou při tvorbě vitamínu D<sub>3</sub> a v biosyntéze cholesterolu. Jeho elektrochemické vlastnosti byly studovány na borem dopované diamantové elektrodě cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií. V prostředí bezvodého acetonitrilu a kyseliny chloristé jako základního elektrolytu, dochází zřejmě k dehydratační reakci. Výchozí látka a její produkty jsou oxidovány při potenciálech +825 a +975 mV měřeným proti Pleskovově nevodné referenční elektrodě. V nevodném prostředí acetonitrilu s chloristanem sodným je 7-dehydrocholesterol přímo oxidován při potenciálu +795 mV a ve směsném prostředí acetonitril-voda při +700 mV. Kromě kyseliny chloristé byl studován vliv i jiných anorganických kyselin. Průběh dehydratace byl sledován spektrofotometricky jako doplňkovou metodou. Kalibrační závislost 7-dehydrocholesterolu byla měřena DPV. V prostředí chloristanu sodného s bezvodým acetonitrilem byl zjištěn limit detekce 0,19  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a ve směsném prostředí acetonitril-voda činil 0,24  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

## Klíčová slova:

7-dehydrocholesterol, borem dopovaný diamant, voltametrie, dehydratace, steroidy

## Abstract:

7-dehydrocholesterol is an indispensable substance in vitamin D<sub>3</sub> production and in cholesterol biosynthesis. Its electrochemical properties were studied on a boron doped diamond electrode by cyclic and differential pulse voltammetry. In non-aqueous medium of acetonitrile and perchloric acid as supporting electrolyte, dehydration reaction most probably occurs. The substance and its products are oxidised at anodic potentials of +825 and +975 mV using the Pleskov non-aqueous reference electrode. In the non-aqueous medium of acetonitrile using sodium perchlorate as the supporting electrolyte, 7-dehydrocholesterol is directly oxidized at +795 mV and in the mixed medium of acetonitrile-water at +700 mV. The influence of other inorganic acids was investigated. The course of dehydration was monitored spectrophotometrically, which was used as the complementary method. Calibration dependence of 7-dehydrocholesterol was measured by DVP. In the non-aqueous medium of acetonitrile using sodium perchlorate as the supporting electrolyte the limit of detection was determined to be 0,19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and in the mixed medium acetonitrile-water using sodium perchlorate as the supporting electrolyte it was 0,24  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

## Key words:

7-dehydrocholesterol, boron doped diamond, voltammetry, dehydration, steroids

Tento výzkum byl proveden v rámci specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260440).

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 18-01710S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 1440217).

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala mojí školitelce RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za její vstřícný přístup, užitečné rady a odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla podekovat Mgr. Janovi Kloudovi za jeho konstruktivní připomínky a čas, který mi věnoval na praktických konzultacích. Nejvíce bych však chtěla poděkovat své rodině za nesmírnou podporu.

# Obsah

Seznam zkratek .....	7
1 Teoretická část .....	8
1.1 Cíl práce.....	8
1.2 Struktura a biologické vlastnosti 7-dehydrocholesterolu .....	8
1.3 Elektrochemické vlastnosti sterolů .....	11
1.4 Metody stanovení 7-dehydrocholesterolu .....	12
1.5 Bórem dopované diamantové elektrody .....	13
2 Experimentální část.....	16
2.1 Použité chemikálie.....	16
2.2 Voltametrie .....	16
2.3 Spektrofotometrická měření .....	16
2.4 Vyhodnocení.....	17
3 Výsledky a diskuze .....	18
3.1 Elektrochemická oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí anorganické kyseliny v acetonitrilu .....	18
3.2 Elektrochemická oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu .....	26
3.3 Kalibrační závislost 7-dehydrocholesterolu v prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu .....	29
4 Závěr .....	32
Použitá literatura .....	33

# Seznam zkratek

BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E$	potenciál [mV]
$E_p$	potenciál píku [mV]
$I$	proud [ $\mu\text{A}$ ]
$I_p$	proud píku [ $\mu\text{A}$ ]
$v^{1/2}$	druhá odmocnina z rychlosti scanu [mV/s]
$t$	čas [min]

# 1 Teoretická část

## 1.1 Cíl práce

Hlavním cílem této bakalářské práce byla studie elektrochemické oxidace steroidní látky 7-dehydrocholesterolu a následná aplikace tohoto procesu pro voltametrickou detekci za použití borem dopované diamantové (BDD) elektrody. Práce navazuje na předchozí práci skupiny Dr. Schwarzové (UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí) zabývající se elektrochemickou oxidací příbuzných steroidních sloučenin, jako jsou žlučové kyseliny a cholesterol [1,2].

## 1.2 Struktura a biologické vlastnosti 7-dehydrocholesterolu

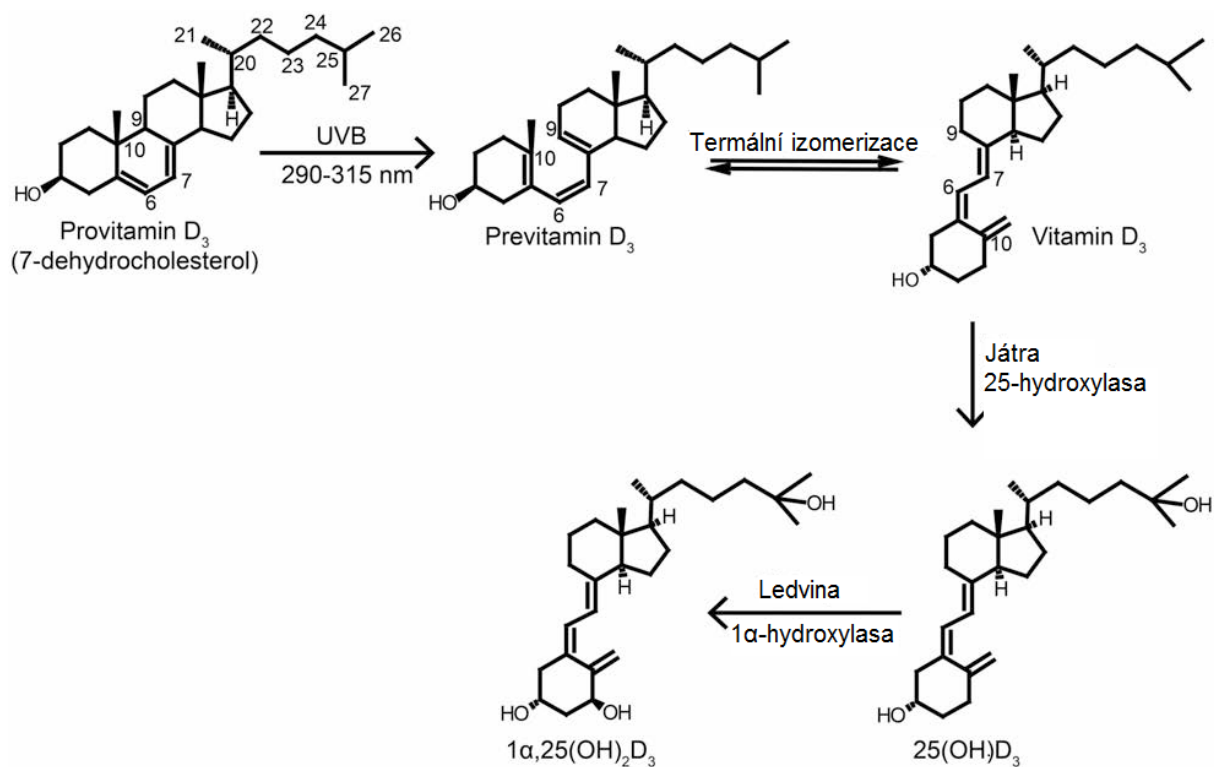
Studovanou látkou byl 7-dehydrocholesterol, jehož přítomnost v lidské kůži umožňuje vytvářet vitamín D<sub>3</sub> a je proto široce využíván v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [3]. Klíčovým meziproduktem je 7-dehydrocholesterol v biosyntéze cholesterolu. Cholesterol slouží jako výchozí látka pro biosyntézu významných sloučenin, jako jsou například steroidní hormony, které do značné míry řídí celou řadu procesů v lidském těle. Obstarávají pohlavní diferenciaci, regulují metabolismy minerálů i vody, glukoneogenezi a v neposlední řadě zprostředkovávají odpověď organismu na stresovou zátěž. Cholesterol také tvoří nezbytnou součást buněčných membrán, v nichž má vliv na fluiditu. Do organismu se cholesterol dostává vstřebáváním z trávicího traktu, do něhož přichází v potravě. Taktéž může být biosyntetizován *de novo* z acetyl-CoA [4,5]. Biosyntéza probíhá sérií enzymatických reakcí, jichž je schopná (kromě erytrocytů) každá buňka, přesto se cholesterolu nejvíce vytváří v játrech [4]. Cholesterol je lipofilní molekula, která je ve vodě jen velmi málo rozpustná. Rozpustnost ve vodném prostředí se pohybuje v rozmezí 26 nmol l<sup>-1</sup> až 25 μmol l<sup>-1</sup>. Dosud nepanuje žádná obecná shoda, a to kvůli jeho extrémně nízké rozpustnosti [6]. Oxidací cholesterolu v játrech vznikají žlučové kyseliny, které jsou, na rozdíl od této lipofilní molekuly, sloučeniny amfipatické, protože obsahují hydrofilní část složenou z karboxylové skupiny připojené na posledním uhlíku (C<sub>27</sub> nebo C<sub>24</sub>) a hydroxylové skupiny na uhlíku C<sub>3</sub>. Nejběžnější žlučové kyseliny také obsahují hydroxylové skupiny na uhlíku C<sub>7</sub>, případně C<sub>12</sub>. Naproti tomu nepolární část, složená ze steroidního jádra a alifatického bočního řetězce, zapříčiňuje lipofilní vlastnosti molekuly. Žlučové kyseliny zajišťují odstraňování



nadbytečného cholesterolu z lidského těla. V tenkém střevě fungují jako emulgátory, jenž snižují povrchové napětí a vytváří homogenní směs, čímž napomáhají trávení i absorpci tuků a lipofilních vitamínů [5].

V krevním řečišti je cholesterol transportován pomocí lipoproteinových komplexů [5]. Nechvalně známý je cholesterol pro své účinky při zvýšené hladině nízkodenzitního lipoproteinu (low density lipoprotein, LDL) frakce v krvi, která je hlavní příčinou aterosklerózy [4]. Ta vzniká v důsledku ukládání cholesterolu z lipoproteinů do tkání arteriálních stěn, což způsobuje zúžení cév a snížení průtoku krve. To může vést k ischemické chorobě srdeční a následně infarktu myokardu. Výše bylo zmíněno, z jakých důvodů je cholesterol tak zásadní sloučeninou pro lidské tělo, tudíž jeho nedostatek může mít také nepříznivé účinky a přináší s sebou možná rizika závažných onemocnění. Bývají jimi geneticky podmíněné defekty v biosyntéze cholesterolu. Smithův–Lemliho–Opitzův syndrom (SLO syndrom), způsobený nedostatkem 7-dehydrocholesterol reduktasy, je nejčastější z nich. Charakteristickým příznakem tohoto onemocnění je těžká hypocholesterolémie a nahromaděný 7-dehydrocholesterol v séru. Projevuje se např. mentální, růstovou retardací, poruchami chování a končetinovými anomáliemi [5].

Prekurzorem je 7-dehydrocholesterol i v případě biosyntézy cholekalciferolu neboli vitamínu D<sub>3</sub> (obr. 2). Nejprve je 7-dehydrocholesterol vlivem slunečního záření, přesněji ultrafialového v rozsahu 290 – 315 nm, fotochemickou konverzí přetvářen na previtamin D<sub>3</sub>. Přeměna probíhá i při nižších vlnových délkách, než je 290 nm, ale takové sluneční záření se nedostává na zemský povrch, protože je zadrženo ozonovou vrstvou. Dvojně vazby 7-dehydrocholesterolu, na uhlíku C<sub>6</sub> a C<sub>7</sub> v B kruhu, absorbují fotony s vysokou energií ze záření a dochází tak k otevření jeho relativně pevné struktury. Ta se skládá ze 4 kruhů a je začleněna do lipidové dvojvrstvy plasmové membrány. Během přeměny 7-dehydrocholesterolu na previtamin D<sub>3</sub> se B kruh rozevře na C<sub>9</sub> a C<sub>10</sub> a membrána vykazuje narůstající permeabilitu k různým iontům, například vápenatým. Previtamin je následně tepelnou izomerací přetvářen na vitamín D<sub>3</sub> [7].

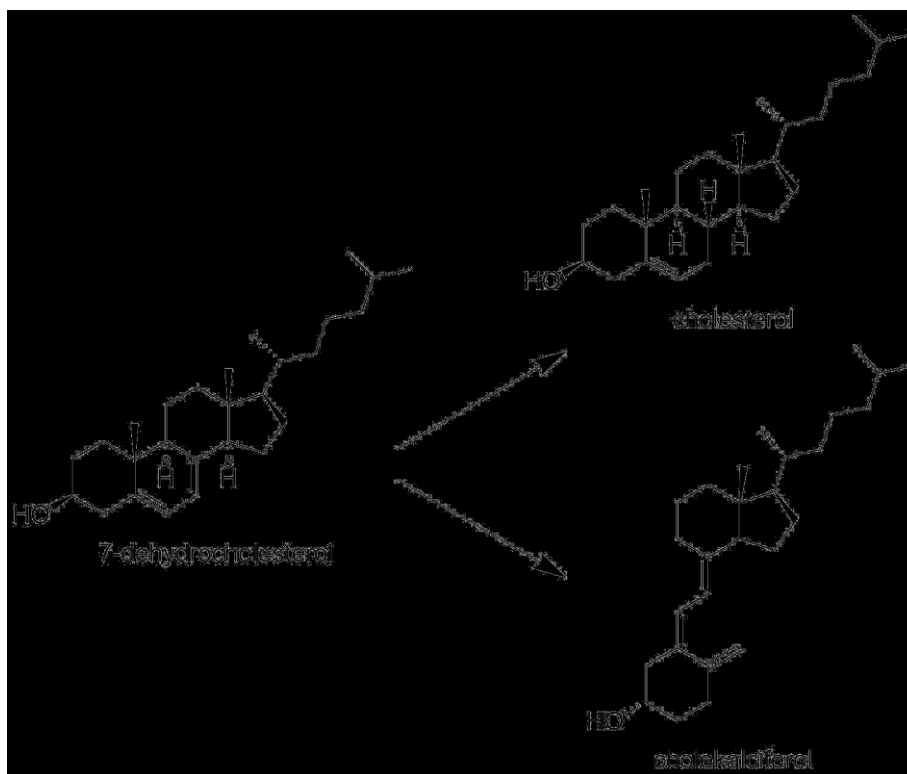


**Obr. 1.1** Syntéza vitamínu D<sub>3</sub> a jeho aktivace hydroxylačními reakcemi. Převzato a přeloženo z [7].

Vitamín z kůže difunduje do krve, kde je transportován proteinem vázajícím vitamín D<sub>3</sub> (vitamin D<sub>3</sub> binding protein, DPB) do jater. Pokud je vitamín D<sub>3</sub> přijímán ze stravy, putuje taktéž do jater, ale jinou cestou. Je absorbován v tenkém střevě a přenášen pomocí chylomikronů a DPB. Vitamín D<sub>3</sub> je biologicky neaktivní, aktivuje se až dvěma hydroxylačními reakcemi (obr. 1.2). V játrech probíhá první hydroxylace na uhlíku C<sub>25</sub> pomocí 25-hydroxylasy a vitamín D<sub>3</sub> se tak přetváří na sloučeninu 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>). Jeho syntéza je velmi špatně regulovaná a závisí především na koncentraci vitamínu D<sub>3</sub>. Za biomarker vitamínu D je brán 25OHD<sub>3</sub>, protože jeho koncentrace odráží celkový stav vitamínu D přijatého ze stravy i z kůže. Jakmile je 25OHD<sub>3</sub> vyprodukován v játrech, přechází za pomoci DPB do ledvin, kde probíhá druhá hydroxylační reakce. 25OHD<sub>3</sub> se hydroxyluje na α pozici uhlíku C<sub>1</sub> vlivem 1α-hydroxylasy a vzniká 1α,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Přeměna z 25OHD<sub>3</sub> na tuto konečnou hydroxylovanou látku je striktně regulována hladinami fosforu a vápníku v séru, dále také hladinou 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> v krvi a parathormonem [7].

Vitamín D<sub>3</sub> je pro lidské tělo důležitý z hlediska regulace a udržení hladin fosforu a vápníku, tudíž přispívá zdravému vývinu skeletu člověka. S nedostatkem tohoto vitamínu, a

tedy 7-DHC, je spojena řada závažných onemocnění. Dochází k řidnutí kostní tkáně neboli k osteoporóze a osteomalacii. Deficit vitamínu  $D_3$  taktéž způsobuje kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus typu I a je spojován s narůstajícím rizikem rakoviny [7].



**Obr. 1.3** – Schematicky znázorněný finální krok biosyntézy cholesterolu a biosyntézy cholekalciferolu (vitamínu  $D_3$ ).

7-dehydrocholesterol je organická sloučenina, která se od cholesterolu liší pouze přítomností dvojné vazby na uhlíku  $C_7$ . Na obrázku 1.3 lze vidět, že se 7-dehydrocholesterol skládá ze tří šestičlenných a jednoho pětičlenného cyklu, tzv. steroidního jádra. Na  $C_3$  je navázána hydroxylová skupina a na uhlíku  $C_5$  a zmiňovaném  $C_7$  obsahuje dvě dvojné vazby. Na uhlík  $C_{17}$  je stejně jako u cholesterolu vázán alifatický postranní řetězec složený z 8 uhlíků.

Cholekalciferol neboli vitamín  $D_3$ , jež má narušený kruh, se nazývá secosteroid [7].

### 1.3 Elektrochemické vlastnosti sterolů

Během posledních deseti let vzrostl zájem o využití elektrochemických metod pro charakterizaci a analýzu steroidních látek, jednak z důvodu velkého významu steroidních látek v biologii, fyziologii a medicíně a jednak protože jiné analytické metody mají podstatné

nedostatky. Steroidní sloučeniny totiž nedisponují velkými rozdíly ve struktuře, zato se vyskytují ve komplexních směsích a matricích, a to někdy ve velmi nízkých koncentracích.

Oxidace a redukce steroidních látek může být energeticky náročná, a proto se potenciál oxidace/redukce zpravidla vyskytuje u okraje potenciálového okna, především pokud sloučenina neobsahuje ve steroidním jádře žádné dvojné vazby. Steroidní jádro neobsahující dvojné vazby je elektrochemicky neaktivní, tudíž možnosti oxidace a redukce sterolů záleží zejména na připojených funkčních skupinách a počtu dvojných vazeb uvnitř jádra [6]. V rámci projektu řešeného UNESCO laboratoří elektrochemie životního prostředí bylo nedávno ukázáno, že steroidní látky, jako jsou žlučové kyseliny nebo cholesterol, je možné chemicky aktivovat tak, aby výsledné produkty poskytovaly voltametrický signál při nižších potenciálech než mateřské molekuly. [1]. Aktivace je dosaženo reakcí mezi steroidním analytem a kyselinou chloristou, kdy dojde k dehydrataci steroidního jádra, zavedení dvojných vazby, a tím ke zvýšení jeho elektrochemické reaktivity. Tato reakce je obdobou Liebermann-Burchardovy reakce cholesterolu, která vede k jeho dehydrataci a zavedení dvojných vazeb do steroidního skeletu. Výsledné produkty absorbují ve viditelné oblasti spektra, a proto se tato metody používá ke stanovení cholesterolu [8].

Po pečlivé literární rešerši byla dohledána jedna vědecké publikace zabývající se elektrochemickým stanovením či chováním 7-dehydrocholesterolu. Jednalo se o stanovení 7-dehydrocholesterolu v lidské kůži pomocí HPLC s amperometrickou detekcí s elektrodovým potenciálem 1,7 V. Ukázalo se, že amperometrický signál je specifický pro steroly s konjugovanými 5,7-dienovými vazbami v kruhu B, jak je tomu v 7-dehydrocholesterolu [9].

## 1.4 Metody stanovení 7-dehydrocholesterolu

Stanovení koncentrace 7-dehydrocholesterolu v krevní plasmě a séru je důležité pro zjištění hned několika poruch biosyntézy cholesterolu, mezi které patří i SLO syndrom, více v kapitole 1.1. Pro stanovení koncentrace 7-dehydrocholesterolu jsou nejčastěji využívány chromatografické metody, ale lze použít i například iontovou mobilní spektrometrii. Z chromatografických metod je nejhojněji používána HPLC a GC.

Nejvyužívanější způsob detekce v kombinaci s HPLC a GC je hmotnostní spektrometrie. Další možné způsoby detekce jsou spektroskopická v UV oblasti a fluorescenční.

Ve většině případů je nutná úprava vzorku před stanovením. 7-dehydrocholesterol se extrahuje rozpouštědlem, kterým bývá methanol, chloroform-ethanol (1:1), n-hexan, hexan-

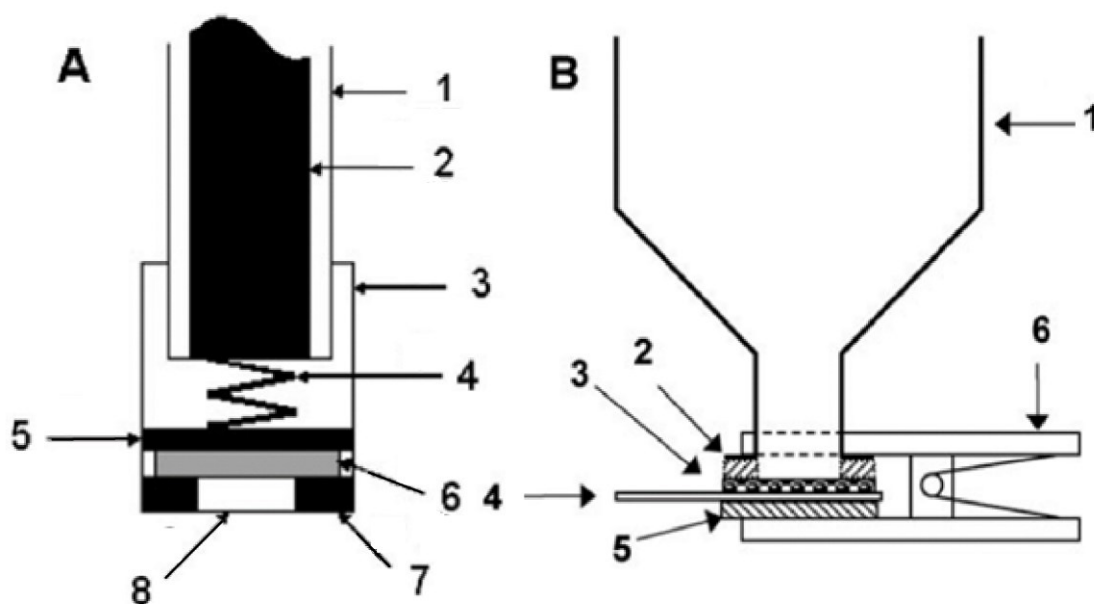
ethanol (1:1). Pro stanovení pomocí GC se 7-dehydrocholesterol derivatizuje za použití N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamidu po dobu 60 minut při 60 °C [10]. Dlouhá doba derivatizace za zvýšené teploty 120 °C je nevýhodou i pro stanovení pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Detekční limit metody je 18 fmol (6,8 pg) v 10 µl nástřiku, což odpovídá koncentraci 1,8 nmol l<sup>-1</sup> [11]. Vysoce citlivá a selektivní je ke sloučenině s dienovou částí metoda HPLC s UV detekcí. Za využití 4-(1-anthryl)-1,2,4-triazolin-3,5-dionu se při mírných podmínkách a za poměrně krátkou dobu vytváří stabilní produkt. Detekční limit této metody je 6×10<sup>-5</sup> nmol l<sup>-1</sup> [12]. Tert-butyldimethylsilyl deriváty mají výborné vlastnosti pro analýzu pomocí GC-MS a vyšší vykazují stabilitu vůči hydrolyze [13]. Příklady stanovení 7-dehydrocholesterolu jsou dále popsány v člancích [10-16].

## 1.5 Bórem dopované diamantové elektrody

Za uplynulých dvacet pět let prošel BDD významným vývojem a jako elektrodový materiál nachází rozmanité uplatnění na poli elektrochemie, kde je využíván od elektrosyntézy, přes elektroanalýzu, až po aplikace v Li-iontových bateriích a palivových člancích [17,18].

Diamant je jedním z nejlepších přírodních izolantů. Jakmile je však dopován borem, přiblíží se dle koncentrace dopantu jeho elektrické vlastnosti látkám polovodivým až látkám s kovovým typem vodivosti, což je velmi užitečné pro elektrochemické měření. Diamantové filmy dopované borem se připravují chemickou depozicí par (chemical vapor deposition, CVD), ke které se nejčastěji používá směs methanu s vodíkem. Dopování borem je zajištěno přidáváním diboranu do této plynné směsi. Koncentrace atomů boru se ve filmu pohybuje okolo 10<sup>20</sup> cm<sup>-3</sup>. Takové množství odpovídá 1 atomu boru na 1000 atomů uhlíku [17,19]. Obsah plynných složek směsi methanu s vodíkem, sloužících jako zdroj uhlíku, a diboranu, zdroje boru, se udává v poměru B/C a vyjadřuje tak míru nadopování, tedy tzv. *doping level*. Pro diamantové filmy připravované pomocí CVD se při depozici používá poměru B/C až 10 000 ppm. Typické podmínky pro růst diamantového filmu jsou následující: tlak 10–100 torr a teploty substrátu dosahující 800 až 1000 °C [18,19]. Substrátem pro depozici BDD filmu je nejčastěji křemík, a to i přes to, že průmyslová výroba elektrod tímto způsobem je značně ztížená jeho křehkostí a relativně nízkou vodivostí, která se taktéž zvyšuje dopováním borem. Z těchto důvodů lze v literatuře vysledovat snahu o použití jiných substrátových materiálů jako je molybden, niob, tantal, nebo levnější titan [17,18]. Přestože byly studovány i další typy dopantů (např. vodík, dusík, síra), je i nadále nejhojněji využíván právě bor [17].

V případě elektrod používaných převážně pro voltametrické měření může být vodivé spojení mezi křemíkovým diskem s deponovaným BDD filmem a tělem elektrody realizováno několika způsoby. Jedním z nich je vsádkový způsob, kdy je diamantový film vložen do teflonového nebo polyetheretherketonového těla (PEEK) elektrody (obr. 1.1A) a utěsněn těsněním (např. značky Viton), v jehož středu je otvor, který definuje plochu pracovní elektrody. Druhým populárním způsobem je umístění BDD disku na dno pracovní cely (obr. 1.1B), kdy je opět třeba kvalitně utěsnit kontakt mezi elektrodou a nádobkou, což je uskutečněno obdobně jako v přechodím případě. Jako nevýhodu tohoto uspořádání lze zmínit značně omezené možnosti manipulace s elektrodou [17,18]. Amperometrický způsob detekce na BDD elektrodách byl úspěšně spojen s průtokovými systémy jako je HPLC, průtoková injekční analýza a kapilární elektroforéza. Pro tento účel bylo navrženo několik typů detekčních cel většinou s elektrodami v tenkovrstvém nebo wall-jet uspořádání. [20].



**Obr. 2.1** Znárodnění BDD elektrod: **A** – disková elektroda, 1 – teflonové tělo elektrody, 2 – nerezová ocel, 3 – šroubovací závin, 4 – kovová pružina, 5 – mosazný plíšek, 6 – BDD/Si elektroda, 7 – těsnění Viton, 8 – prostor pro přístup roztok. **B** – skleněná cela s připnutou BDD elektrodou, 1 – skleněná cela, 2 – těsnění Viton, 3 – BDD/Si tenkovrstvá elektroda, 4 – měděné proudusběrné desky, 5 – izolační podložka, 6 – svorka. Převzato z [21].

Elektrochemické stanovení organických látek na pevných elektrodách je často ztíženo pasivací elektrody. Tu zapříčiňuje ireverzibilní ulpívání produktů elektrochemické reakce nebo některých složek vzorku na povrchu elektrody. Elektrody s převažujícími uhlíkovými atomy s  $sp^2$  hybridizací obsahují na povrchu polární skupiny, a jsou proto citlivé na adsorpci

polárních látek. Naproti tomu BDD filmy jsou tvořeny  $sp^3$  uhlíkovými atomy a jsou proti adsorpci polárních látek poměrně odolné, tudíž méně náchylné vůči pasivaci a představují vhodný elektrodový materiál pro stanovení organických i anorganických látek bez nutné úpravy povrchu [17].

Pro elektrochemii nabízí BDD množství výhodných vlastností. Z důvodů již výše zmíněných poskytuje dobrou odezvu mnoha redoxních analytů bez předchozí úpravy povrchu před stanovením. Diamantový film dále disponuje širokým potenciálovým oknem, které v závislosti na kvalitě filmu dosahuje obvykle hodnot až 3,5 V. Tato unikátní vlastnost dává prostor pro elektrochemické reakce při potenciálech obtížně dosažitelných na jiných elektrodových materiálech, obzvláště v oblasti kladných potenciálů. Mezi další výhodné vlastnosti BDD se řadí vysoká tepelná vodivost, biokompatibilita. Je také odolný vůči korozi a má nízký zbytkový proud. Vedle chemické i mechanické stability poskytuje tento elektrodový materiál výbornou mikrostrukturální stabilitu při extrémních katodických i anodických potenciálech [17,18].

BDD elektrody mohou sloužit jako elektrochemické senzory a také pro detekci látek znečišťujících životní prostředí. Byla vyvinuta řada vsádkových voltametrických a amperometrických metod, které využívají BDD elektrod pro stanovení různých organických sloučenin, jak je shrnuto v review [22-24]. Konkrétně se používají v organické analýze při stanovení pesticidů, fenolů a jejich chlorovaných derivátů, polycyklických aromatických uhlovodíků a dalších biologicky aktivních dusíkatých a sírných látek. Mimo jiné umí BDD zbavit odpadní vody enviromentálních polutantů jejich kompletní oxidací na oxid uhličitý nebo přeměnou na biokompatibilní sloučeniny [17,21]. Očištění odpadních vod elektrochemickou oxidací je shrnuto v review [25].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

Studovanou látkou byl 7-dehydrocholesterol zakoupený od firmy Sigma–Aldrich. Deklarovaná minimální čistota byla 95 %.

Ostatní použité chemikálie byly, pokud není uvedeno jinak, analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Penta), kyselina chloristá 70% (Lach-Ner), kyselina sírová 96% (Lach-Ner), kyselina dusičná 65% (Lach-Ner), bezvodý chloristan sodný (Fluka), dusičnan stříbrný (Fluka) a alumina (Elektrochemické detektory, Turnov).

### 2.2 Voltametrie

Měření metodou cyklické a diferenční pulzní voltametrie probíhala na přístroji Eko-Tribo Polarograf se softwarem Polar-Pro verze 5.1 (EcoTrend Plus, Praha).

Pracovní elektrodou byla bórem dopovaná diamantová elektroda, o průměru 3 mm ( $A=7,1 \text{ mm}^2$ ) od výrobce Windsor Scientific (Slough, Velká Británie), která se skládá z BDD disku umístěného v elektrodovém těle z materiálu PEEK. Před zaznamenáním každé voltametrické křivky byla elektroda leštěna pomocí suspenze aluminu v destilované vodě, pokud není uvedeno jinak.

Pracovní prostor, ve kterém byla ponořena pracovní elektroda s pomocnou, byl od referenční elektrody oddělen meziprostorem, naplněným  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  chloristanem sodným v acetonitrilu. Referenční elektroda se skládala ze stříbrného drátku ponořeného do roztoku  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  dusičnanu stříbrného spolu s  $1 \text{ mol l}^{-1}$  chloristanem sodným v acetonitrilu. Pomocnou elektrodu tvořil inertní platinový drátek.

### 2.3 Spektrofotometrická měření

Ke změření absorpčních spekter v ultrafialové a viditelné oblasti byl využit jednocestný přístroj Hewlett–Packard UV/VIS spektrofotometr 8453 s křemennou kyvetou o délce 1 cm.



## 2.4 Vyhodnocení

Limity detekce byly spočteny jako podíl trojnásobku směrodatné odchylky hodnot proudů pro deset měření nejnižší detekovatelné koncentrace a směrnice kalibrační přímky.

K výpočtům, vyhodnocení dat a grafů posloužily programy: Polar-Pro (Eko-Trend, Plus, ČR), OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, USA), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA) a kalkulačka Casio fx-350 ES PLUS.

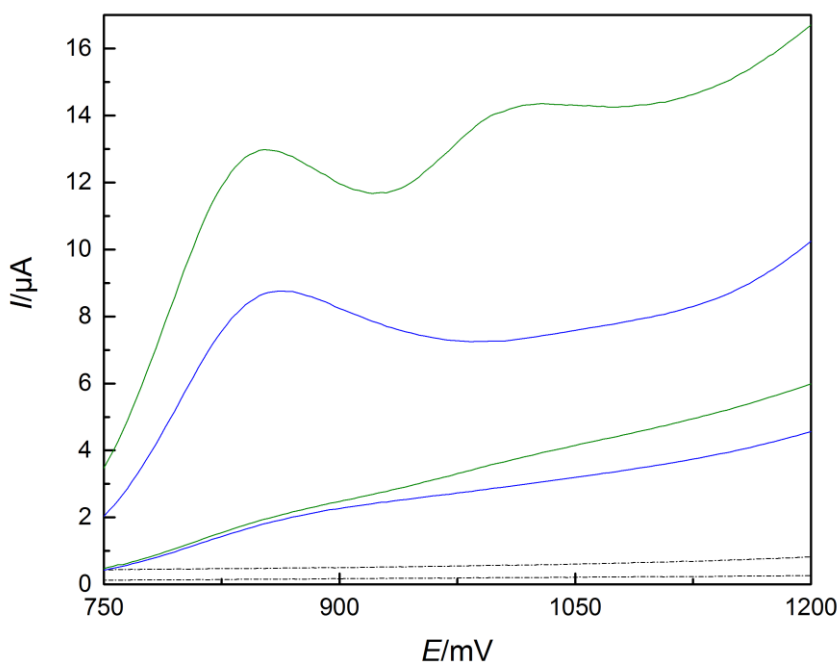
## 3 Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou shrnuty výsledky dosažené při studiu elektrochemické oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí acetonitrilu za použití kyseliny chloristé a chloristanu sodného jako základního elektrolytu. Studován byl také vliv dalších kyselin (sírové, dusičné, fosforečné). Dále jsou zde také prezentovány výsledky spektrofotometrického sledování stability 7-dehydrocholesterolu v různých prostředích jako doplňkové metody k voltametrickým měřením.

### 3.1 Elektrochemická oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí anorganické kyseliny v acetonitrilu

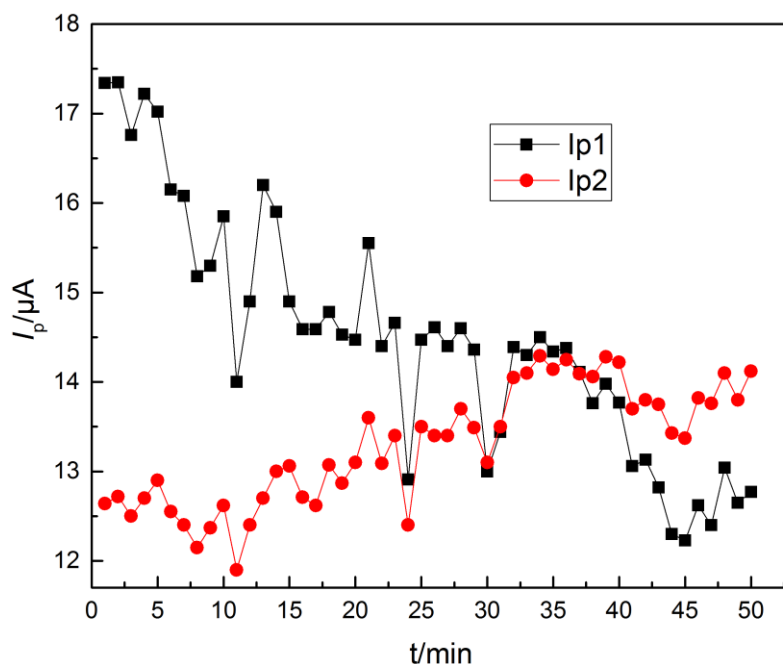
Na základě výsledků publikovaných Kloudou *et al.* [1] byla první měření provedena v prostředí 0,1 mol l<sup>-1</sup> kyseliny chloristé v acetonitrilu. Toto prostředí obsahuje 0,43 % vody, která pochází ze 70% kyseliny chloristé a bylo zvoleno s ohledem na kompatibilitu s postupem použitelným pro voltametrické či amperometrické stanovení cholesterolu, kdy kyselina chloristá slouží nejen jako základní elektrolyt, ale také jako nezbytný reaktant chemicky aktivující molekulu cholesterolu.

Z obrázku 3.1 je patrné, že pokud je měření provedeno ihned po smíšení roztoku 7-dehydrocholesterolu s kyselinou chloristou, první pík s časem klesá a druhý pík roste. Tato proměna průběhu voltametrické odezvy je důsledkem probíhající reakce mezi 7-dehydrocholesterolem a kyselinou chloristou. Velmi pravděpodobně dochází k dehydratační reakci, obdobně jako v případě žlučových kyselin [1] a ke vzniku elektrochemicky aktivního produktu, který je reprezentován přítomností druhého píku. V tomto stádiu však nebyly provedeny analýzy pro potvrzení struktury vznikajícího/ch produktu/ů, ty budou předmětem dalšího studia.



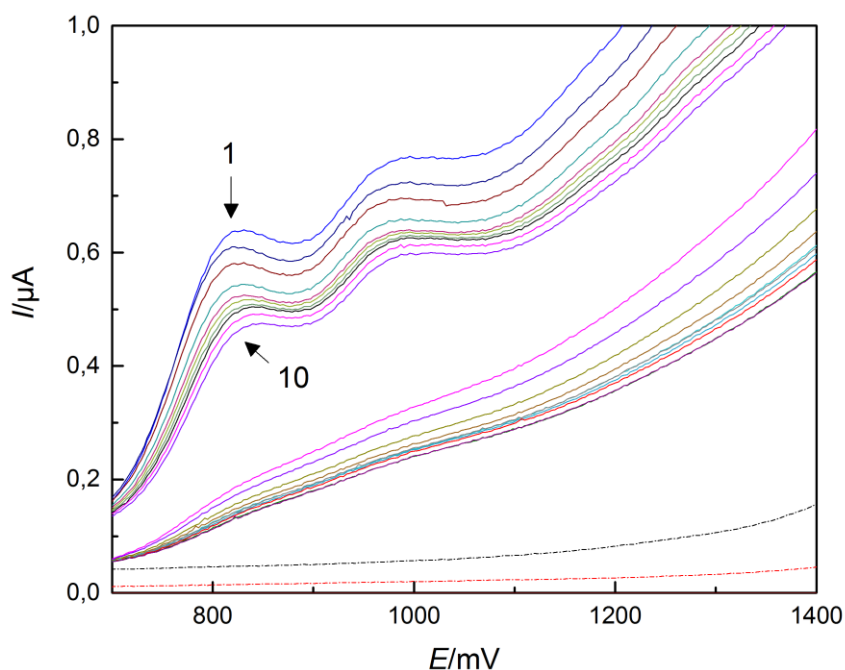
**Obr. 3.1** Cyklické voltamogramy 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí kyseliny chloristé ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) v acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu 1000 mV/s, měřeno v rozsahu +400 až +1800 mV. Voltamogramy zaznamenaný v 1. minutě od smíchání je znázorněn modrou křivkou a v 50. minutě zelenou. Základní elektrolyt je znázorněn tečkovaně.

Na obrázku 3.2 je zobrazen vývoj intenzity signálů prvního a druhého píku 7-dehydrocholesterolu po dobu padesáti minut. Vývoj intenzity signálů obou píků ukazuje, že signál prvního píku klesá a signál druhého naopak postupně stoupá, což odpovídá výše popsané hypotéze chemické přeměně elektrochemicky aktivní látky (první pík, signál v čase 0) na jinou elektrochemicky aktivní látku (s časem postupně rostoucí druhý pík). Je také patrné, že signál není příliš stabilní a pro analytické účely by ho bylo možné využít pouze po předchozí optimalizaci. Příklad použití dehydratujících silných kyselin jako základního elektrolytu a chemického reaktantu je především situace, ve které je třeba v jednom kroku stanovit 7-dehydrocholesterol vedle dalších analytů, které je nutno tímto způsobem chemicky aktivovat, protože jejich mateřské molekuly neposkytují elektrochemickou odezvu. Stanovení ve směsi lze předpokládat například s cholesterolem.



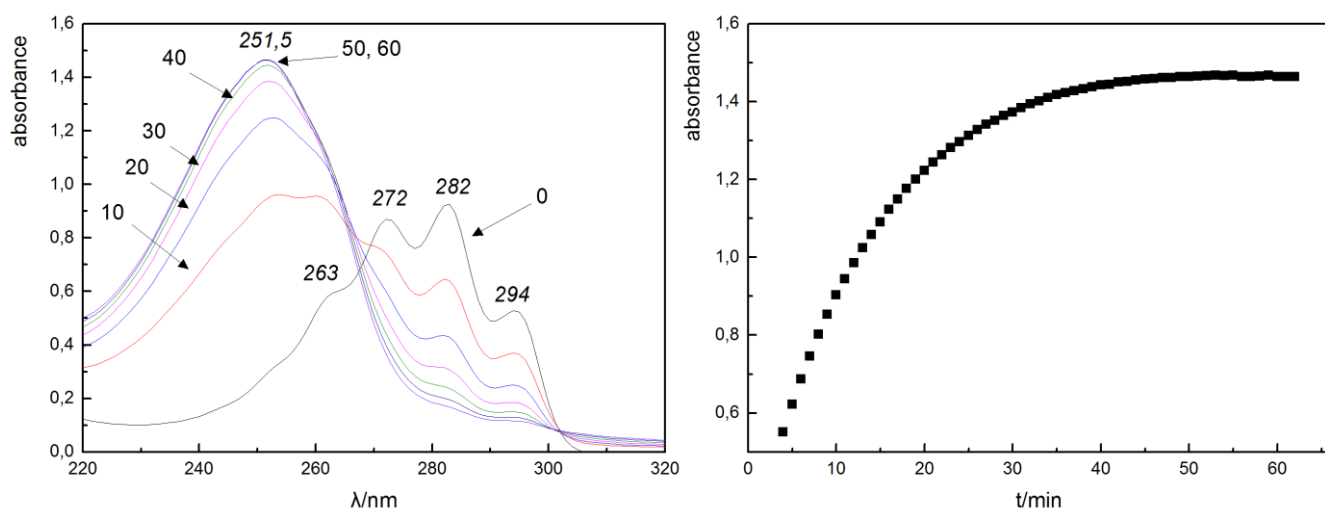
**Obr. 3.2** Vývoj hodnot proudu prvního a druhého píku cyklických voltamogramů směsi 7-dehydrocholesterolu ( $c = 9 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a  $\text{HClO}_4$  ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) v acetonitrilu. S obsahem vody 0,43 %. Záznam voltametrické odezvy směsi probíhal každou minutu po dobu 50 minut. Rychlost skenu 1000 mV/s, měřeno v rozsahu +400 až +1800 mV.

Na obrázku 3.3 je zobrazeno 10 následných záznamů voltametrické odezvy 7-dehydrocholesterolu s kyselinou chloristou v 44. minutě od smíchání v ustáleném stavu. Jsou na něm patrné dva anodické píky, první okolo +825 mV a druhý okolo +975 mV. Ve zpětném skenu nebyly zaznamenány žádné signály studované látky, tj. reakce je irreverzibilní. Z obrázku je patrné, že dochází k postupnému poklesu signálu, což je důsledek pasivace elektrody, nikoliv dehydratace. Tento efekt lze velmi jednoduše eliminovat leštěním elektrody za pomoci aluminy, jak je popsáno v kapitole 3.3, kdy byla elektroda leštěna z důvodu zajištění opakovatelné odezvy pro vývoj voltametrické metody pro stanovení 7-dehydrocholesterolu.



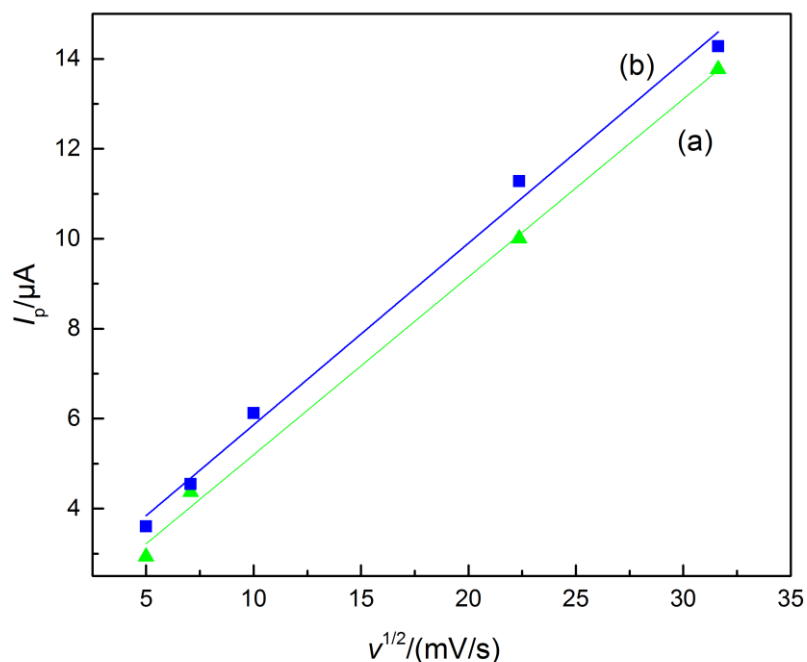
**Obr. 4.3** Cyklické voltamogramy 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$  v prostředí acetonitrilu S obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu  $50 \text{ mV/s}$ , měřeno v rozsahu  $-420$  až  $+1800 \text{ mV}$ . Voltamogramy zaznamenány po 44 minutách od smíšení roztoku 7-dehydrocholesterolu a  $\text{HClO}_4$ . 10 následných skenů. Základní elektrolyt je znázorněn tečkovaně.

Průběh reakce mezi 7-dehydrocholesterolem a kyselinou chloristou byl sledován také spektrofotometricky. Výsledky, zobrazené na obrázku 3.4, jsou v souladu s voltametrickými měřeními. Spektrum se s časem opět výrazně mění. Píky při vyšších vlnových délkách (272, 282, 294 nm) klesají a mizí, zatímco se objevuje pík při 251,5 nm, který se stabilizuje po přibližně 40 minutách, což je doba potřebná k dosažení ustáleného stavu i ve voltametrických měřeních.



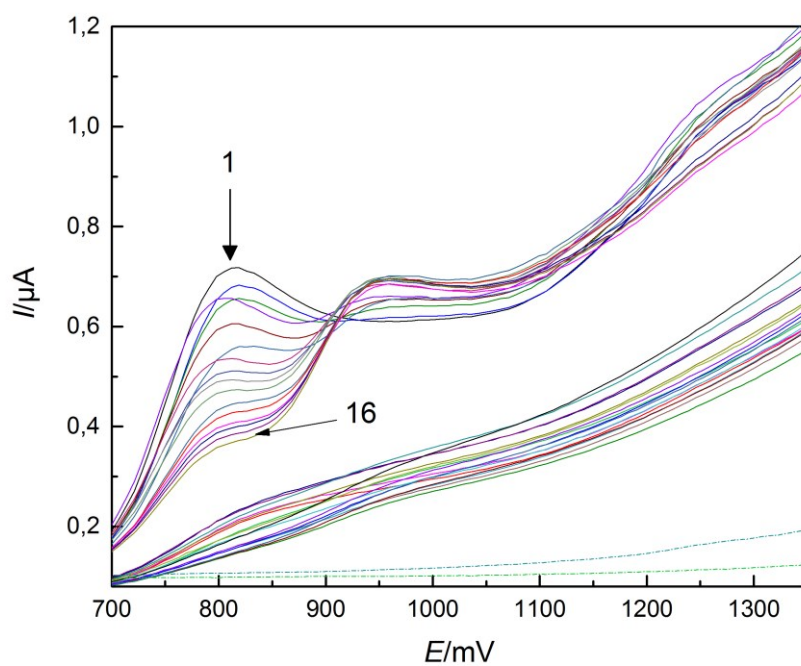
**Obr. 3.4** (A) UV spektrum směsi 7-dehydrocholesterolu ( $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ) a  $\text{HClO}_4$  ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) v acetonitrilu, s obsahem vody 0,43 %. Spektrum směsi bylo zaznamenáno každou minutu po dobu 62 minut. Jsou zobrazena spektra zaznamenaná v časech 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min. Kurzívou jsou vyznačeny vlnové délky jednotlivých píků. (B) Vývoj hodnoty absorbance píku 251,5 nm v čase.

Dále byl metodou cyklické voltametrie studován charakter elektrochemického děje. Na obrázku 3.5 je zobrazena závislost výšky prvního a druhého píku ve čtyřicáté minutě po smíšení na druhé odmocnině z rychlosti skenu. Tato závislost je lineární s rovnicemi lineární regrese pro první pík  $I [\mu\text{A}] = +0,39 \times v^{1/2} [\text{mV/s}] + 1,6$  a pro druhý pík  $I [\mu\text{A}] = +0,40 \times v^{1/2} [\text{mV/s}] + 1,8$ , z čehož lze usuzovat na difúzí řízený děj.



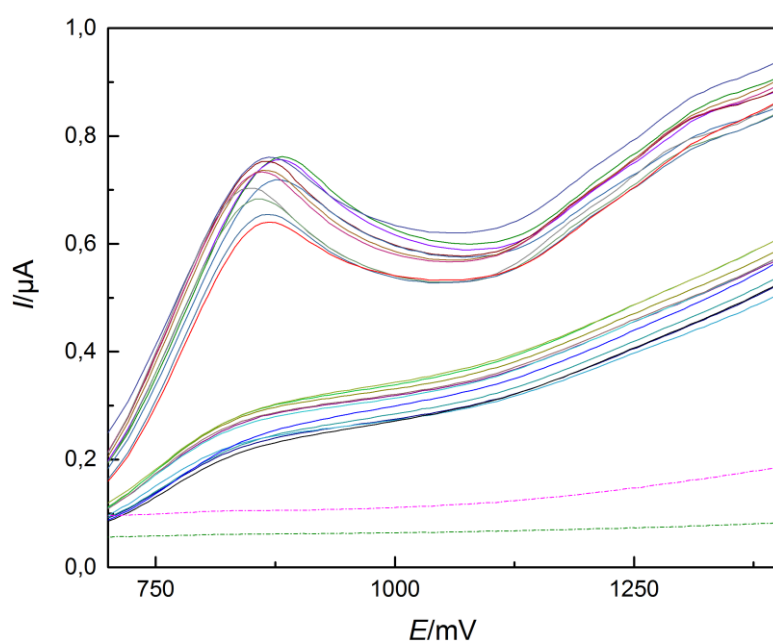
**Obr. 3.5** Závislost proudu (a) prvního a (b) druhého píku 7-dehydrocholesterolu ( $c = 9 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na druhé odmocnině z rychlosti skenu. Základní elektrolyt  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$  v prostředí acetonitrilu. Měření proběhlo 40 minut po smíšení roztoku 7-dehydrocholesterolu a  $\text{HClO}_4$ .

Dále byl studován vliv dalších anorganických kyselin na voltametrický signál 7-dehydrocholesterolu. Studován byl vliv těchto kyselin: sírové, dusičné a fosforečné. Obdobně jako v případě směsi s kyselinou chloristou byly od smíchání roztoku 7-dehydrocholesterolu a zvolené kyseliny postupně pořizovány voltametrické záznamy, které ilustrovaly případnou chemickou přeměnu analytu. Z obrázků 3.6 – 3.8 je patrné, že průběh voltametrických záznamů se měnil pouze v případě použití kyseliny sírové (obr. 3.8), které je známa silnými dehydratačními vlastnostmi. Při použití zbývajících dvou kyselin (dusičné a fosforečné) se průběh voltamogramů výrazně neměnil a ve směsi tedy zřejmě nedocházelo k žádné reakci, při které by se tvořily za daných podmínek oxidovatelné produkty.

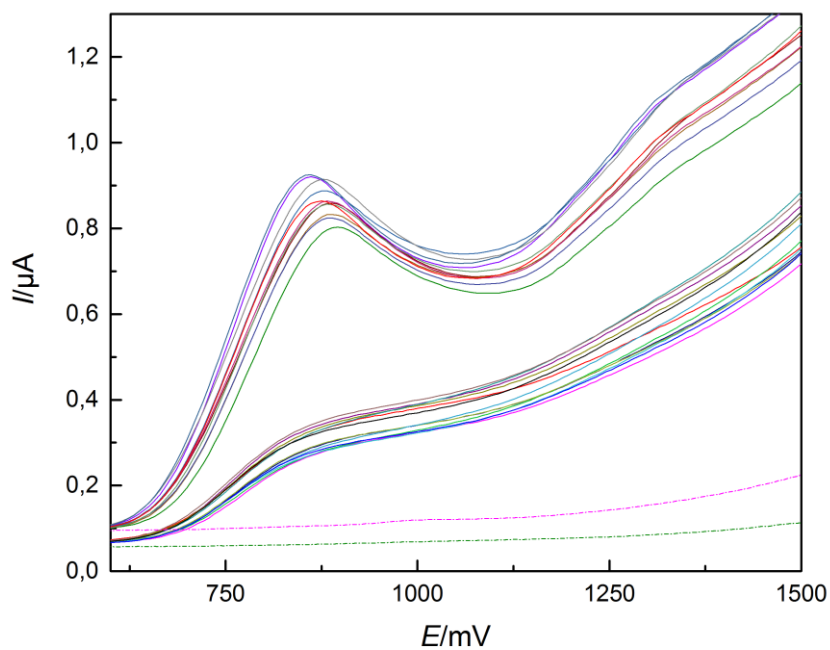


**Obr. 3.6** Cyklické voltamogramy 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,041 %. Rychlost skenu  $50 \text{ mV/s}$ , měřeno v rozsahu  $+400$  až  $+1800 \text{ mV}$ . Záznam 3 skenů probíhal každé 3 až 4 minuty po dobu 56 minut. Zobrazeny jsou 1. skeny. Základní elektrolyt je zobrazen tečkovaně.





**Obr. 3.7** Cyklické voltamogramy 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,34 %. Rychlost skenu  $50 \text{ mV/s}$ , měřeno v rozsahu  $+400$  až  $+1800 \text{ mV}$ . Záznam 3 skenů probíhal každé 3 minuty po dobu 32 minut. Zobrazeny jsou 1. skeny. Základní elektrolyt je zobrazen tečkovaně.



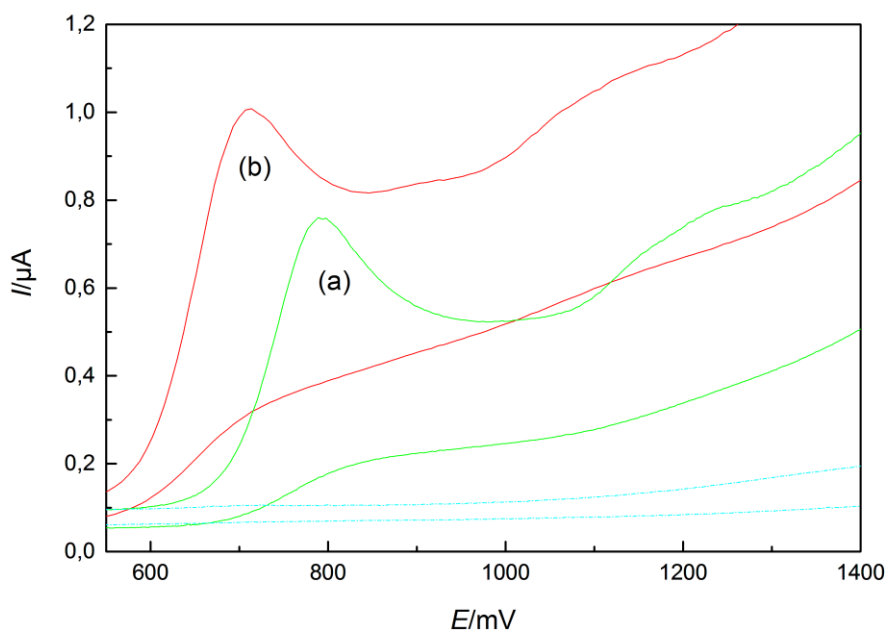
**Obr. 3.8** Cyklické voltamogramy 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,174 %. Rychlost skenu  $50 \text{ mV/s}$ , měřeno v rozsahu  $+400$  až

+1800 mV. Záznam 3 skenů probíhal každé 3 minuty po dobu 42 minut. Zobrazeny jsou 1. skeny. Základní elektrolyt je zobrazen tečkovaně.

Z výsledků prezentovaných v této kapitole je zřejmé, že použití dehydratující kyseliny (chloristá, sírová) jako základního elektrolytu s sebou nese významné nedostatky. Prvním a největším je časová nestabilita signálu, kdy dosažení stabilní odezvy trvá minimálně 40 minut. Jako další nedostatky lze jmenovat: při aplikaci postupu pro amperometrickou detekci v HPLC značné omezení výběru kolon z důvodu nekompatibility kyselého prostředí a kolon využívajících ve své konstrukci silikagel a obecně práci v agresivním prostředí.

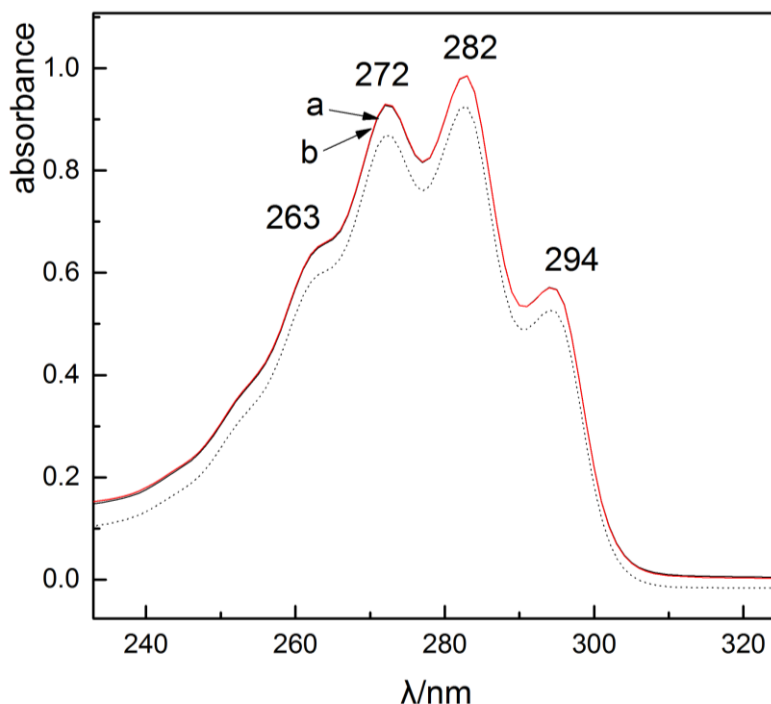
### **3.2 Elektrochemická oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu**

V předchozí kapitole byla prezentována možnost oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí kyseliny indukující přeměnu 7-dehydrocholesterol na elektrochemicky aktivní produkt (chloristá, sírová) a kyseliny zastávající pouze roli základního elektrolytu (dusičná, fosforečná). Zároveň byly představeny nevýhody takového postupu a situace, kdy je i přes zmíněné nevýhody postup vhodné použít. Z obrázku 3.9 je patrné, že 7-dehydrocholesterol poskytuje dobře vyvinutý voltametrický signál okolo +795 mV i v prostředí  $\text{NaClO}_4$  acetonitrilu, respektive okolo +700 mV ve směsném prostředí acetonitril voda (95:5). K určení, zda k žádné chemické reakci mezi základním elektrolytem a analytem nedochází a signál tedy náleží přímo 7-dehydrocholesterolu, nebo se uplatňuje chemická přeměna sterolu díky oxidujícím účinkům chloristanu, byla dále provedena spektrofotometrická studie.



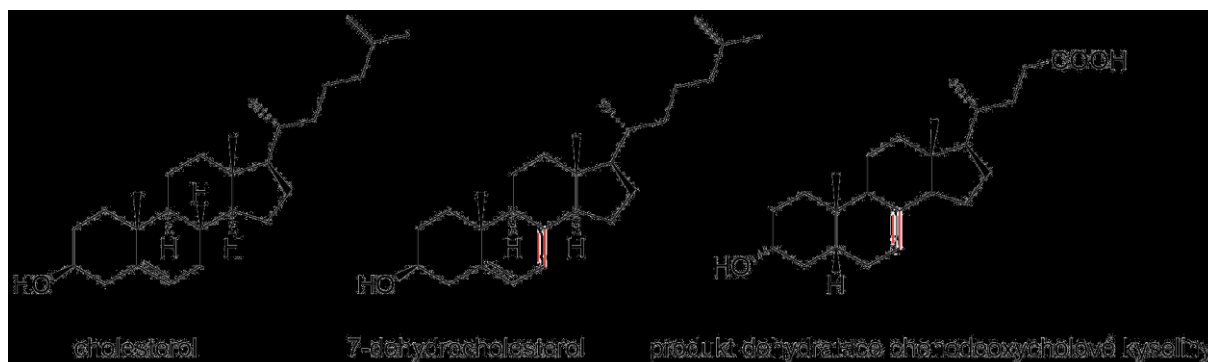
**Obr 3.9** Cyklické voltamogramy 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v  $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$  v prostředí (a) acetonitrilu bez přídavku vody a (b) v prostředí acetonitrilu s 5% přídavkem vody. Rychlost skenu  $50 \text{ mV/s}$ , měřeno v rozsahu  $+400$  až  $+1800 \text{ mV}$ . Zobrazeny jsou 1. skeny. Základní elektrolyt je zobrazen tečkovaně.

Z obr. 3.10 je zřejmé, že se spektrum 7-dehydrocholesterolu po smíšení s  $\text{NaClO}_4$  v čase neměnilo a bylo téměř identické se spektrem, které poskytoval 7-dehydrocholesterol v  $\text{HClO}_4$  okamžitě po smíšení. Lze tedy předpokládat, že voltametrický signál přísluší přímo 7-dehydrocholesterolu.



**Obr. 3.10** - UV spektrum směsi 7-dehydrocholesterolu ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a  $\text{NaClO}_4$  ( $c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$ ) v acetonitrilu. Spektrum směsi bylo zaznamenáno každou minutu po dobu 15 minut. Jsou zobrazena spektra zaznamenaná v časech (a, červeně) 0 a (b, černě) 15 min, která se prakticky překrývají. Tečkovaně UV spektrum směsi 7-dehydrocholesterolu ( $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ) a  $\text{HClO}_4$  ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) v acetonitrilu v čase 0.

Tato vlastní elektrochemická aktivita odlišuje voltametrické chování 7-dehydrocholesterolu od cholesterolu či žlučových kyselin a je způsobena přítomností dvojné vazby na  $\text{C}_7$ , což je jediný strukturní rozdíl mezi 7-dehydrocholesterolem a cholesterolem. Dvojná vazba na této pozici byla navržena jako část struktury aktivované žlučové kyseliny zodpovědná právě za její zvýšenou elektrochemickou aktivitu [1]. Struktury 7-dehydrocholesterolu, cholesterolu a chenodeoxycholové kyseliny po dehydrataci jsou zobrazeny na obrázku 3.11, dvojná vazba na  $\text{C}_7$  je ve struktuře zvýrazněna červeně.



**Obr. 3.11** Struktury cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a produkt dehydratace kyseliny chenodeoxycholové.

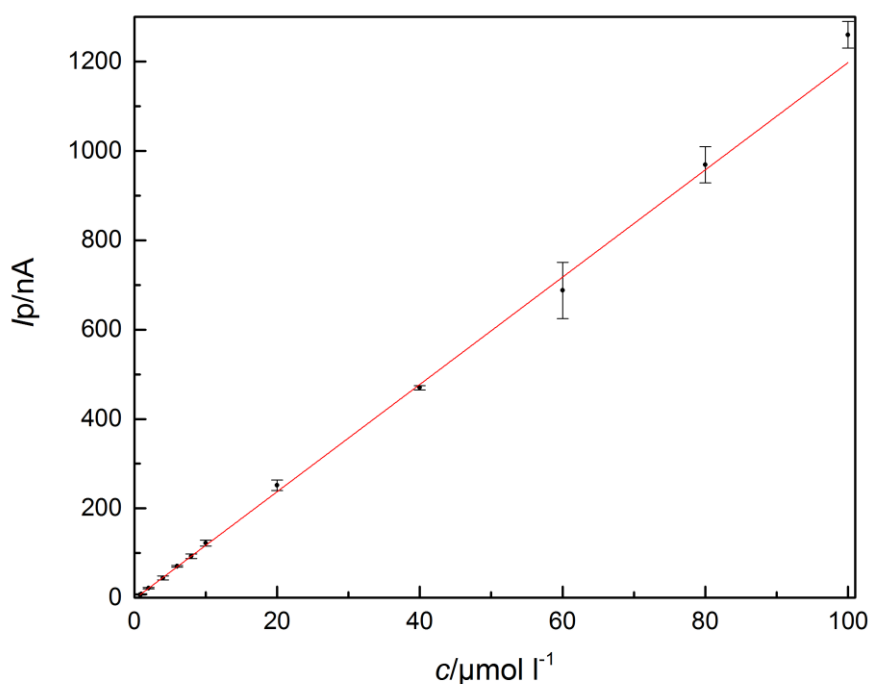
### 3.3 Kalibrační závislost 7-dehydrocholesterolu v prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu

Díky dobré voltametrické odezvě a spektrofotometricky potvrzené stabilitě 7-dehydrocholesterolu bylo prostředí acetonitrilu obsahující  $\text{NaClO}_4$  jako základní elektrolyt zvoleno jako vhodné vývoj metody pro detekci 7-dehydrocholesterolu metodou diferenční pulzní voltametrie (DPV). Nejprve byly optimalizovány následující parametry DPV: výška pulzu, šířka pulzu a rychlost skenu. Optimalizace byla provedena za použití roztoku 7-dehydrocholesterolu o koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  a následující parametry byly zvoleny jako optimální: výška pulzu: 100 mV, šířka pulzu: 10 ms a rychlost skenu: 50 mV/s. Za těchto podmínek byly změřeny kalibrační závislosti v nevodném prostředí acetonitrilu a ve směsném prostředí acetonitril-voda (95:5), vždy obsahujícím  $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$  jako základní elektrolyt. Mezi každým měřením byla elektroda leštěna za pomoci suspenze aluminu v destilované vodě, čímž byl eliminován efekt pasivace elektrody. Kalibrační závislosti jsou zobrazeny na obrázcích 3.12 a 3.13 a jejich parametry jsou shrnuty v tabulce 3.1. Kalibrační závislost v nevodném prostředí byla lineární v celém zvoleném rozsahu, který byl na jedné straně ohraničen nejnížší detekovatelnou koncentrací a na druhé straně zvolenou hodnotou  $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ , nad níž nelze v případě fyziologických vzorků očekávat aplikaci metody. Kalibrační závislost ve směsném prostředí vykazovala pro nízké koncentrace mírně konvexní průběh, což se projevilo úsekem o vyšší záporné hodnotě. Nevodné prostředí se tedy z hlediska parametrů kalibrační přímky jeví jako vhodnější. V případě praktického využití lze však očekávat preferenci směsného prostředí, jak z hlediska větší volnosti ve volbě mobilní

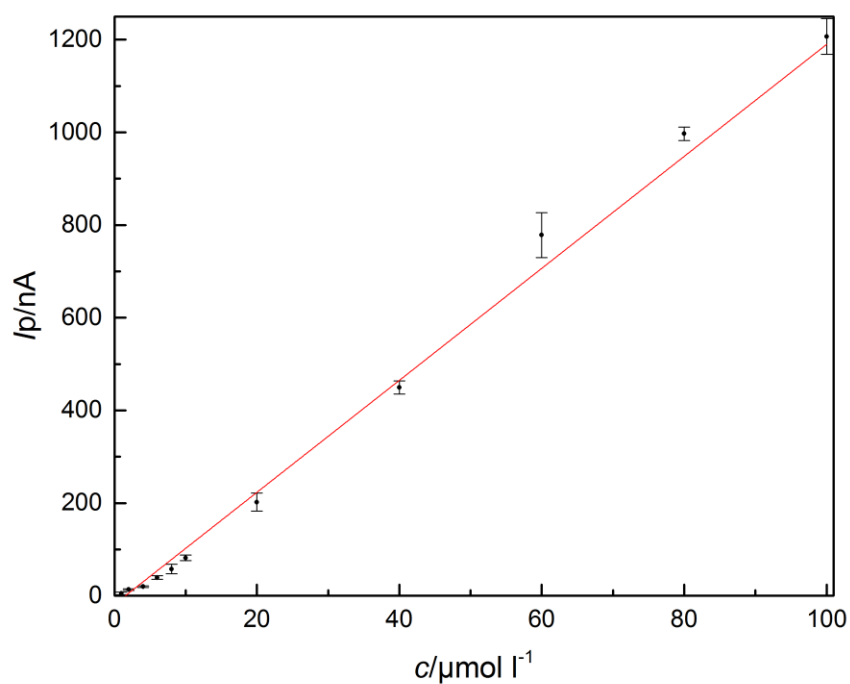
fáze v separačních systémech, tak z hlediska žádoucí eliminace organických rozpouštědel z analytických postupů.

**Tab. 3.1** – Parametry kalibračních závislostí 7-dehydrocholesterolu a limit detekce (LOD) v prostředí 0,01 mol l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> s acetonitrilem za různých podmínek.

Prostředí	NaClO <sub>4</sub> s acetonitrilem	NaClO <sub>4</sub> acetonitril-voda (95:5)
rovnice kalibrační přímky	$I [\text{nA}] = +12,00 \times c [\mu\text{mol l}^{-1}] - 2,90$	$I [\text{nA}] = +12,08 \times c [\mu\text{mol l}^{-1}] - 18,59$
R <sup>2</sup>	0,9991	0,9803
LOD, $\mu\text{mol l}^{-1}$	0,19	0,24
koncentrační rozsah, $\mu\text{mol l}^{-1}$	0,8 – 100	1 – 100



**Obr. 3.12** Kalibrační závislost 7-dehydrocholesterolu v prostředí 0,01 mol l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu. Koncentrace 7-dehydrocholesterolu:  $8 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro pět měření.



**Obr. 3.13** Kalibrační závislost 7-dehydrocholesterolu v prostředí  $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$  ve směsném acetonitril-voda (95:5). Koncentrace 7-dehydrocholesterolu:  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro pět měření.

## 4 Závěr

Vytyčeným cílem této bakalářské práce byla elektrochemická studie 7-dehydrocholesterolu a jeho reakčních produktů na borem dopované diamantové elektrodě. Možnosti elektrochemické oxidace 7-dehydrocholesterolu byly nejprve studovány v prostředí acetonitrilu za použití kyseliny chloristé jako základního elektrolytu. Na základě výsledků experimentů bylo zjištěno, že zřejmě dochází k dehydratační reakci a signál se stabilizuje až po čtyřicáté minutě. Proto byl jako základní elektrolyt zvolen chloristan sodný v acetonitrilu. Bylo zjištěno, že 7-dehydrocholesterol poskytuje voltametrický signál i v nezměněné podobě. Proto ho není nutné, na rozdíl od cholesterolu či žlučových kyselin, chemicky aktivovat za pomoci dehydratační reakce. Dále byl studován vliv jiných anorganických kyselin: sírové, trihydrogenfosforečné a dusičné. Dehydratační účinek byl však pozorován pouze u kyseliny chloristé a sírové. Metodou diferenční pulzní voltametrie byla změřena kalibrační závislost 7-dehydrocholesterolu s chloristanem sodným v bezvodém acetonitrilu, kde byl limit detekce  $0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ , ve směsném prostředí acetonitril voda byl  $0,24 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Zde prezentovaná metoda má vyšší limit detekce než chromatografické metody (méně než  $1,8 \text{ nmol l}^{-1}$ ), avšak je to metoda instrumentálně a časově nenáročná. Předmětem dalšího studia bude identifikace produktů reakce s kyselinou chloristou, studium mechanismu oxidace a aplikace metody na stanovení 7-dehydrocholesterolu ve vzorcích plasmy a séra.



# Použitá literatura

- [1] Klouda, J.; Barek, J.; Kočovský, P.; Herl, T.; Matysik, F. M.; Nesměrák, K.; Schwarzová–Pecková, K.: Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid–induced dehydration. *Electrochem. Commun.*, **86**, 99–103 (2018)
- [2] Klouda, J.: Elektrochemická oxidace žlučových kyselin na elektrodách na bázi uhlíku. Možnosti využití v elektroanalýze. Diplomová práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK (2015)
- [3] Kim, S. H.; Youn, J.Y.; Kim, K.M.; Kang, K.C.; Pyo, H.B; Lee, S.J.: Characterization of an inclusion complex of, 7-dehydrocholesterol and cyclodextrin. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **16**, 119–121. (2010)
- [4] Klouda, J.; Barek, J.; Nesměrák, K.; Schwarzová–Pecková, K.: Non-Enzymatic Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **47**, 384-404 (2017)
- [5] Lubanda, H.; Vacek, M.: Cholesterol: A Friend or Foe? *Chem. Listy*, **103**, 40–51 (2009)
- [6] Matsuoka, K.; Kuranaga, Y.; Moroi, Y.: Solubilization of cholesterol and polycyclic aromatic compounds into sodium bile salt micelles (Part 2). *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1580**, 200-214 (2002)
- [7] Jäpelt, R. B.; Jakobsen, J.: Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, **4** (2013)
- [8] Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Pang, J.: The Liebermann-Burchard reaction: Sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids*, **42**, 87–96 (2007)
- [9] Moody, J. P.; Humphries, C.A.; Allan, S.M.; Paterson, C.R.: Determination of 7-dehydrocholesterol in human skin by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **530**, 19–27 (1990)
- [10] Matysik, S.; Klunemann, H. H.; Schmitz, G.: Gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of oxysterols, plant sterols, and cholesterol precursors. *Clin. Chem.*, **58**, 1557–1564 (2012)
- [11] Iwata, T.; Hanazn, H.; Nakamura, M.; Ohkura, Y.: Determination of 7-dehydrocholesterol lipids by high performance liquid fluorescence detection. *Anal. Sci.*, **5**, 671–673 (1989)

- [12] Oe, T.; Mizuguchi, T.; Shimada, K.: Cookson-type reagents: Application to the determination of 7-dehydrocholesterol in human skin surface. *Anal. Sci.*, **7**, 171–172 (1991)
- [13] Paik, M. J.; Yu, L.; Hu, M. B.; Kim, S. J.; Kim, K. R.; Ahn, Y. H.; Choi, S.; Lee, G.: Gas chromatographic-mass spectrometric analyses of cholesterol and its precursors in rat plasma as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Clin. Chim. Acta*, **396**, 62–65 (2008)
- [14] Xu, L. B.; Kliman, M.; Forsythe, J. G.; Korade, Z.; Hmelo, A. B.; Porter, N. A.; McLean, J. A.: Profiling and imaging ion mobility-mass spectrometry analysis of cholesterol and 7-dehydrocholesterol in cells via sputtered silver MALDI. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **26**, 924–933 (2015)
- [15] Shimada, K.; Oe, T.; Mizuguchi, T.: Cookson-type reagents: highly sensitive derivatization reagents for conjugated dienes in high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **116**, 1393–1397 (1991)
- [16] Yasumura, M.; Okano, T.; Mizuno, K.; Kobayashi, T.: Identification and determination of 7-dehydrocholesterol in rat skin. *Journal of nutritional science and vitaminology*, **23**, 513–523 (1977)
- [17] Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chem. Listy*, **103**, 469–478, (2009)
- [18] Pecková, K.; Musilová, J.; Barek, J.: Boron–Doped Diamond Film Electrodes—New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **39**, 148–172 (2009)
- [19] Xu, J.; Granger, M. C.; Chen, Q.; Strojek, J. W.; Lister, T. E.; Swain, G. M.: Boron–doped diamond thin–film electrodes. *Anal. Chem.* **69**, A591– A597 (1997)
- [20] Maixnerová, L.; Barek, J.; Pecková, K.: Thin-Layer and Wall-Jet Arrangement of Amperometric Detector with Boron-Doped Diamond Electrode: Comparison of Amperometric Determination of Aminobiphenyls in HPLC-ED. *Electroanalysis*, **24**, 649–658 (2012)
- [21] Barek, J.; Fisher, J.; Navrátil, T.; Pecková, K.; Yosypchuk, B.; Zima, J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis*, **19**, 2003–2014 (2007)

- [22] Peckova, K.; Barek, J.: Boron Doped Diamond Microelectrodes and Microelectrode Arrays in Organic Electrochemistry. *Current Organic Chemistry*, **15**, 3014–3028 (2011)
- [23] Einaga, Y.: Diamond electrodes for electrochemical analysis. *Journal of Applied Electrochemistry*, **40**, 1807–1816 (2010)
- [24] Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Glennon, J. D.: Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *The Analyst*, **134**, 1965 (2009)
- [25] Garcia–Segura, S.; Ocon, J. D.; Chong, M. N.: Electrochemical oxidation remediation of real wastewater effluents — A review. *Process Safety and Environmental Protection*. Institution of Chemical Engineers, **113**, 48–67. (2018)